

Chemische eiwitsynthese in beeld

Citation for published version (APA):

Hackeng, T. M. (2009). *Chemische eiwitsynthese in beeld*. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/spe.20091009th>

Document status and date:

Published: 09/10/2009

DOI:

[10.26481/spe.20091009th](https://doi.org/10.26481/spe.20091009th)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

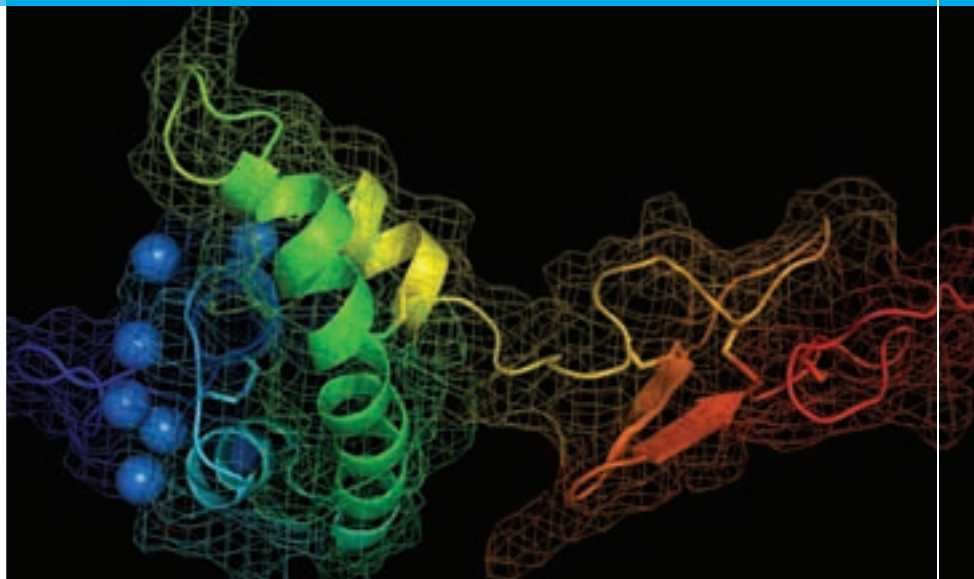
providing details and we will investigate your claim.



Prof. dr. Tilman M. Hackeng

Faculty of Health, Medicine and Life Sciences

Chemische eiwitsynthese in beeld



Chemische eiwitsynthese in beeld

Colofon

Ontwerp en print: Océ Business Services, Maastricht

Illustratie omslag: Dr. Gerry Nicolaes

ISBN: 978-90-5681-323-9

NUR: 915

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt worden, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de auteur of uitgever.

Chemische eiwitsynthese in beeld

Maastricht, 9 oktober 2009

Door Prof. dr. Tilman M. Hackeng

*“...Wat vloeit in mijn bloedvaten
tussen duizende dansende cellen,
kan met structuren spellen
wat ik in geen duizende uren
van kansen duizelende
kan vertellen...”*

Leo Vroman (1955)

*Mijnheer de Rector,
Geachte Decaan,
Waarde Collega's
Lieve familie en vrienden,
Geachte toehoorders,*

Ik sta hier vandaag voor U om mijn vak te presenteren, de Chemische Biologie van Hart en Vaatziekten. In het bijzonder zal ik het hebben over het volledig chemisch maken van eiwitten. Tijdens mijn lezing zal ik U uitleggen wat chemische eiwitsynthese inhoudt, en waarom het zo belangrijk is. Voor de meeste onder U zijn chemische biologie en eiwitsynthese nog nietszeggende woorden, maar over drie kwartier kunt U met mij tijdens de receptie over de toekomst van mijn onderzoek praten.

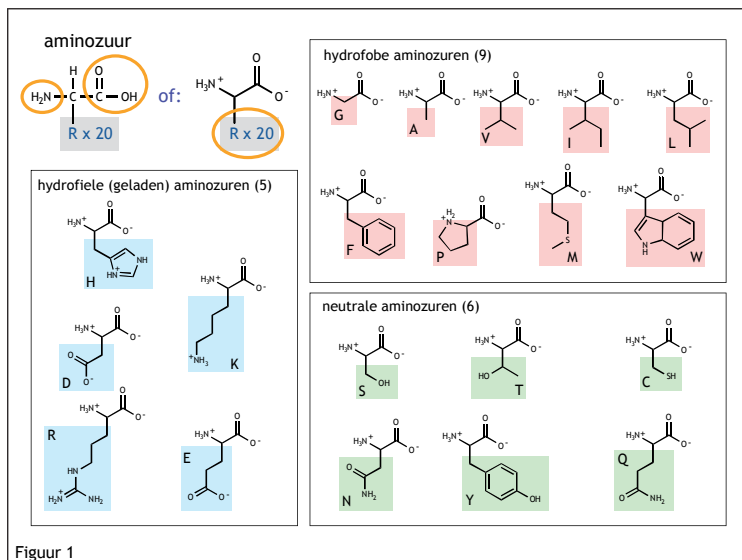
U denkt wellicht dat ons genetisch materiaal, ons DNA, ons maakt tot wie we zijn, tot hoe we eruit zien, en tot hoe wij denken. Welnu, laat ik U uit de droom helpen. Ons DNA namelijk, bevat uitsluitend de *code* voor de *eiwitten* die we tijdens ons leven nodig hebben. Eiwitten doen mee aan álle denkbare processen die zich in ons lichaam afspelen. Eiwitten kunnen enzymen zijn die reacties uitvoeren, ze kunnen dienen als bouwstenen, ze zijn verantwoordelijk voor de werking van ons zenuwstelsel. Ze zorgen voor onze spiercontractie, ze laten ons bloed stollen na een verwonding, eiwitten laten ons zien, ze zorgen voor afweer tegen ziektes, en laten ons verliefd of verdrietig zijn.

Als functies van eiwitten verstoord worden door erfelijke of omgevingsfactoren kan dit aanleiding geven tot ernstige ziektebeelden, zoals de ziekte van Alzheimer, kanker en hart- en vaatproblemen. Er hoeft maar één foutje te zitten in een eiwit en het gehele bijbehorende biologische proces kan in elkaar storten. Het is een feit: het DNA bevat weliswaar onze blauwdruk, maar het zijn de eiwitten die ons maken tot wat wij zijn. Eiwitten herbergen het geheim van het leven, de rest is water, kalk, en vet.

Onze eiwitten zijn opgebouwd uit lange ketens van aminozuren. Stelt U zich een lange kralenketting voor waarbij ieder kraaltje één aminozuur is. Al deze kralen worden in ons lichaam op een bepaalde volgorde aan elkaar geregen op basis van informatie uit het DNA. Bij het samenstellen van deze kettingen kan ons lichaam kiezen uit 20 verschillende aminozuren waarbij het aantal en de volgorde van aminozuren uniek is voor ieder eiwit.

Ik ga allereerst met u terug naar school om uit te leggen hoe eiwitten precies zijn opgebouwd, en hoe eiwitten hun uiteindelijke volwassen opgevouwen 3-dimensionale vorm krijgen. Want alléén als deze juiste vorm bereikt is kunnen eiwitten hun belangrijke taken in ons lichaam gaan vervullen.

Eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren, we hebben er 20 [figuur 1].



Alle aminozuren hebben een identieke basis die bestaat uit een $-\text{NH}_2$ groep ofwel een *aminogroep*, en een $-\text{COOH}$ groep ofwel een *zuurgroep*, vandaar de naam aminozuur. We kunnen deze aminozuren op verschillende manieren chemisch tekenen. De 20 verschillende restgroepen van de aminozuren, ofwel *R* genaamd, kunnen we indelen in drie groepen, ten eerste diegenen die van water houden, de zogenaamde hydrofiele aminozuren, ten tweede diegenen die water juist afstoten, de zogenaamde hydrofobe aminozuren, en tenslotte de neutrale aminozuren.

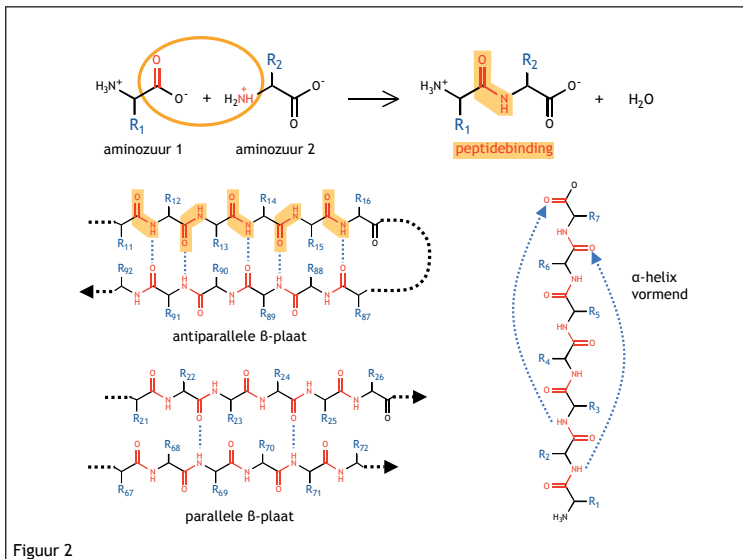
Eiwitten worden gemaakt in onze cellen nadat de aminozuurvolgorde is afgelezen van ons DNA gedurende het zogenaamde transcriptieproces. De aminozuren worden in de cel aan elkaar gezet tot een lange keten door ribosomen, die zelf ook uit eiwitten bestaan, tijdens het zogenaamde translatieproces. Zoals u wellicht weet is eergisteren de Nobelprijs voor de scheikunde toegekend aan Ramakrishnan, Steitz, en

Yonath voor hun baanbrekende werk om de 3-dimensionale structuur van deze ribosomen in kaart te brengen. Dit onderstreept nog eens het belang dat gehecht wordt aan eiwitten in de huidige wetenschappelijke samenleving.

Na de translatie is het eiwit echter nog niet klaar, maar het moet eerst nog worden opgevouwen om zijn driedimensionale vorm en activiteit te verkrijgen. In veel gevallen wordt er ook daarna nog wat aan het eiwit gesleuteld, een aminozuur kan dan nog veranderd worden, of er kunnen suikergroepen aan het eiwit gekoppeld worden. Al deze veranderingen noemen we post-translationele modificaties.

Als een aminozuursketen zich dan als eiwit opvouwt, zullen de hydrofiele aminozuren zich aan de buitenkant van het eiwit ophouden en in contact zijn met de waterige lichaamsvloeistoffen. De hydrofobe aminozuren echter zullen zich binnenin het eiwit ophouden. Daar zullen ze door uitsluiting van water en wederzijdse aantrekkingskrachten van de hydrofobe restgroepen een stabiele eiwitkern vormen.

Hoe worden nu de aminozuren aan elkaar gekoppeld, hoe rijg je de kralen van een ketting aan elkaar? Wel, in onze cellen worden de aminozuren aan elkaar gekoppeld door middel van zogenaamde peptidebindingen [figuur 2].

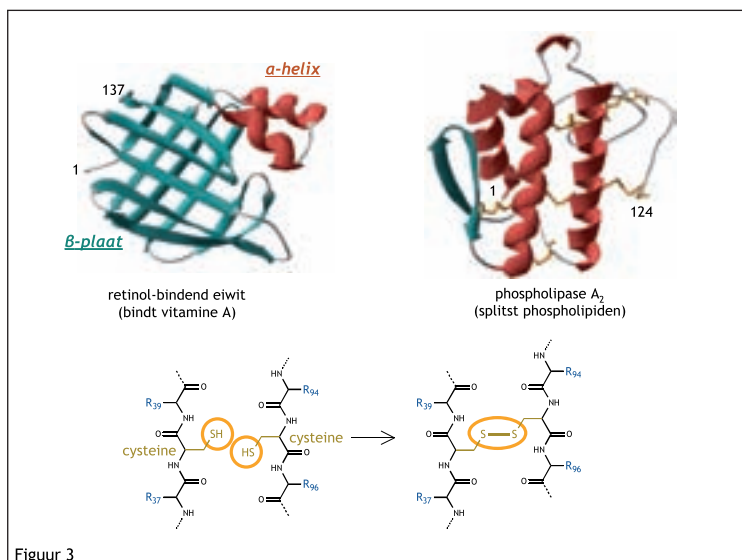


Figuur 2

Peptidebindingen worden gevormd uit de reactie van een zuurgroep van het ene aminozuur met de aminogroep van een ander aminozuur. Bij het vormen van een peptidebinding komt water vrij.

Een eiwit is dus éigenlijk een lange keten van peptidebindingen met aan weerszijden de functionele restgroepen van de aminozuren. Deze lange keten van peptidebindingen wordt ook wel de eiwitruggegraat genoemd en draagt in belangrijke mate bij aan de stevigheid van het opgevouwen eiwit. Daar bovenop kunnen peptidebindingen elkaar in de eiwitketen aantrekken doormiddel van waterstofbruggen. Dit zijn geen echte bindingen, maar aantrekkingskrachten die we aangeven met stippeellijntjes. Deze plaatselijke interacties binnen een eiwitketen zullen het eiwit stabiel maken waardoor de actieve conformatie, de vorm van het gevouwen eiwit, behouden blijft.

Deze waterstofbruggen komen in verschillende structuren voor: de antiparallele β -plaat, waarbij de waterstofbruggen worden gevormd met een deel van de eiwitketen die de *andere* richting op loopt, de parallelle β -plaat waarbij de waterstofbruggen worden gevormd met een deel van de eiwitketen die *dezelfde* richting op loopt, en de α -helix, waarbij de waterstofbrug wordt gevormd met een aminozuur 4 posities verderop in de eiwitketen. Door de aantrekkingskracht van de waterstofbruggen bij deze laatste vorm zal de eiwitketen zich oprollen en een spiraal of helixvorm gaan aannemen. Deze bovengenoemde structurele elementen komen in meer of mindere mate in alle eiwitten voor [figuur 3].



Er bestaan eiwitten die voornamelijk uit β -plaat structuur bestaan, of voornamelijk uit α -helix structuur, maar het merendeel van de eiwitten bestaat uit een mengvorm. Als extra versteviging dienen de cysteine aminozuren, die harde zwavelbruggen kunnen slaan tussen verschillende delen van eiwitketens, en zo de actieve conformatie van het eiwit helpen behouden.

De hier getoonde eiwitmodellen noemen we om begrijpelijke redenen serpentinemodellen. U heeft deze modellen vast wel eens gezien want ze staan met enige regelmaat in de wetenschappelijke bijlage van de NRC of de Volkskrant.

Hoewel U dit waarschijnlijk in eerste instantie zult ontkennen, heeft U allen ruime ervaring op het gebied van gevouwen eiwitstructuren. Immers, verhitting van eiwit zal leiden tot het verbreken van waterstofbruggen en óntvouwing van eiwitten, waarna de binnenste hydrofobe aminozuren tevoorschijn komen en de kans krijgen om aan de hydrofobe delen van andere ontvouwen eiwitten te binden en zo kunnen samenklonteren in een proces wat denaturatie heet [figuur 4].

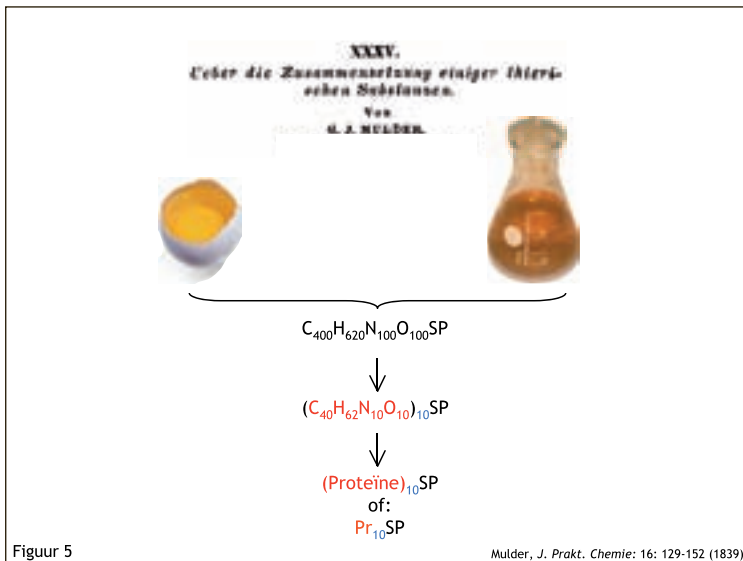


Eiwitten sturen processen in ons lichaam voornamelijk op twee manieren: ten eerste kan een eiwit een peptidebinding in een ander eiwit verbreken of een aminozuur veranderen, om het eiwit te activeren of te inactiveren, en dan spreken we over een enzym-substraat reactie.

Ten tweede kan een eiwit aan een ander eiwit binden, en zo een signaal doorgeven, en dan spreken we van een ligand-receptor interactie. Het is belangrijk om te weten dat hier een sleutel-slot theorie aan ten grondslag ligt. Dit houdt in dat één specifiek eiwit slechts op één specifiek ander eiwit past voor het sturen van één bepaald proces.

De internationale wetenschappelijke naam voor eiwitten is proteïnen, waarvan het concept een oer-Hollandse vinding is. 170 jaar geleden publiceerde de Utrechtse chemicus Gerhardus Johannes Mulder een belangrijke ontdekking waarbij hij de term “proteïne” voor het eerst publiekelijk gebruikte.

Mulder nam een ei en bloedserum en onderwierp die aan een scheikundige elementenanalyse [figuur 5].

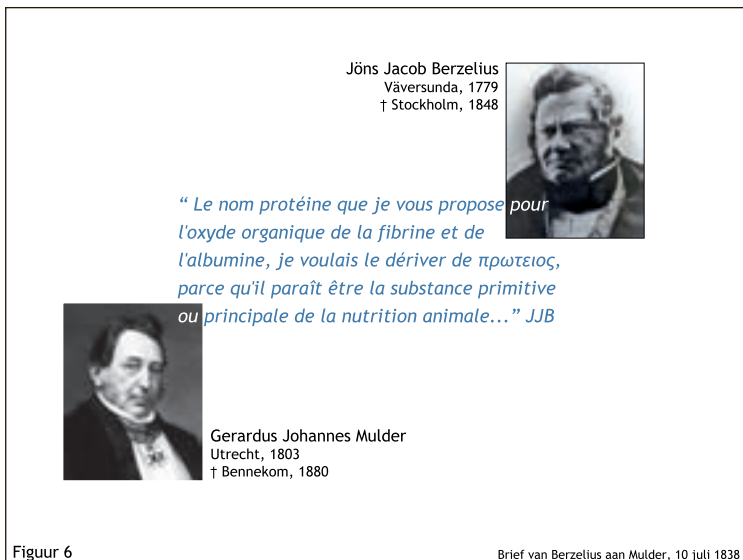


Hij vond daarin voornamelijk de elementen koolstof, waterstof, zuurstof, stikstof, en een klein beetje zwavel en fosfor. Toen hij de hoeveelheid fosfor op 1 stelde en de hoeveelheid andere elementen hier naar omrekende kreeg hij een chemische formule die identiek was in beide uitgangsmaterialen, namelijk $C_{400}H_{620}N_{100}O_{100}SP$. Hij trok toen de belangrijke conclusie dat het zeer waarschijnlijk was dat het hoofdbestanddeel van de stoffen die hij had onderzocht bestond uit een samenstelling van zwavel en fosfor in een meervoudige verbinding met een aantal grote moleculen $C_{40}H_{62}N_{10}O_{10}$.

Dit grote molecuul noemde hij “proteïne” in zijn publicatie en hij definieerde de eiwitstoffen in ei en in serum als Pr_{10}SP .

De naam proteïne ontstond het jaar daarvoor in een briefwisseling tussen Mulder en zijn Zweedse collega Jöns Jacob Berzelius die op 10 juli 1838 aan Mulder schreef:

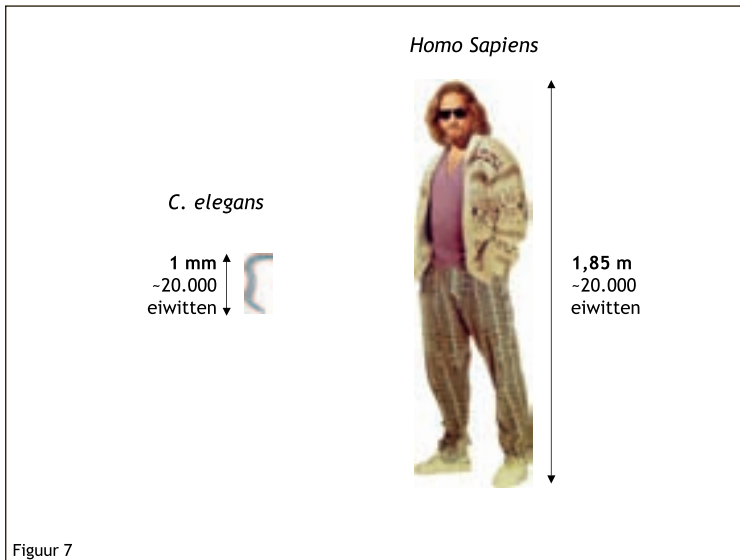
“Ik stel de naam 'proteïne' voor voor het organische oxide van fibrine en albumine, hetwelk ik zou afleiden van het Griekse woord $\pi\rho\omega\tau\epsilon\iota\omicron\varsigma$, omdat het de voornaamste substantie of hoofdbestanddeel van dierlijke voeding lijkt te zijn” [figuur 6].



Mulder en Belzelius zaten dicht bij de waarheid, ze berekenden de kleinste op hele getallen afgeronde gemiddelde aminozuursamenstelling van een eiwit. Maar het idee dat een eiwit was opgebouwd uit kleinere bouwstenen was geboren, en de naam proteïne is gebleven!

Als wij nadenken over het aantal processen die zich in ons lichaam afspelen, en als de sleutel-slot theorie ook maar gedeeltelijk waar is, moeten wij mensen wel vreselijk veel verschillende eiwitten hebben. Toen aan het einde van de vorige eeuw het humane genoom werd opgehelderd, bleek inderdaad dat het DNA van de mens ongeveer 20.000 genen bezat die codeerden voor minimaal 20.000 eiwitten. Toch volgde een storm van verontwaardiging toen de mensheid zich realiseerde dat zij evenveel genen en dus eiwitten bezat als het kleine,

wetenschappelijk veel bestudeerde wormpje *C. Elegans* van slechts 1 mm lang dat zich ophoudt in grond en in composthopen [figuur 7].



Gelukkig volgde snel de realisering dat de posttranslationale veranderingen van eiwitten bij de mens op een veel hoger peil stonden, zodat er van één eiwit blauwdruk toch meerdere verschillende eiwitvarianten geproduceerd konden worden, en men het uiteindelijke aantal eiwitten wist op te kloppen tot het 5-voudige. Toen ook nog bleek dat de veel omvangrijkere stukken DNA die zich tussen de coderende delen bevonden en vroeger bekend stonden als *junk DNA* belangrijk bleken voor de complexe regulatie van transcriptie, was de eer van *Homo Sapiens* gered.

De belangrijkheid van intact genetisch materiaal bij de mens is U bekend: één kleine verandering in ons genetisch materiaal die een verandering van één aminozuur veroorzaakt in één van de 20000 basiseiwitten kan het verschil tussen leven en dood betekenen.

Om biologische eiwitprocessen die in ons lichaam plaatsvinden te kunnen onderzoeken hebben biochemici de betreffende eiwitten het liefst zuiver in handen, om er experimenten mee te doen, en om ze te manipuleren. Hoe komen biochemici nu aan die eiwitten, dat kan op 3 manieren: Ten eerste kunnen eiwitten gezuiverd worden uit menselijk materiaal. Ten tweede kan een stukje DNA dat codeert voor het betreffende

eiwit worden ingebouwd in het genetische materiaal van bacteriën, gisten, en zoogdiercellen zodat die het voor ons kunnen maken in het laboratorium. Als derde mogelijkheid, U raadt het al, kunnen eiwitten helemaal chemisch gemaakt worden, zonder tussenkomst van welk biologisch systeem dan ook. Chemische eiwitsynthese en het gebruik daarvan bij het ontdekken van ziekte is waar het vandaag om draait! De pionier op het gebied van chemische eiwitsynthese was Emil Fischer, Duitse chemicus en Nobelprijswinnaar die leefde rond de vorige eeuwwisseling [figuur 8].



Fischer was de eerste die nadat hij eiwitten had ontleedt in hun aminozuren, deze vervolgens weer aan elkaar wist te koppelen met peptidebindingen tot zogenaamde peptides, kleine eiwitten. Toen deze chemische heldendaad de pers bereikte schreef deze in 1907 dat “..het levensmysterie weldra ontraadseld zou zijn...”

Fischer begreep als een van de eersten het belang van de organische chemie voor het begrijpen van de eiwitbiologie. In een voorwoord in een van zijn boeken over peptidesynthese uit 1906 schrijft hij over eiwitonderzoek:

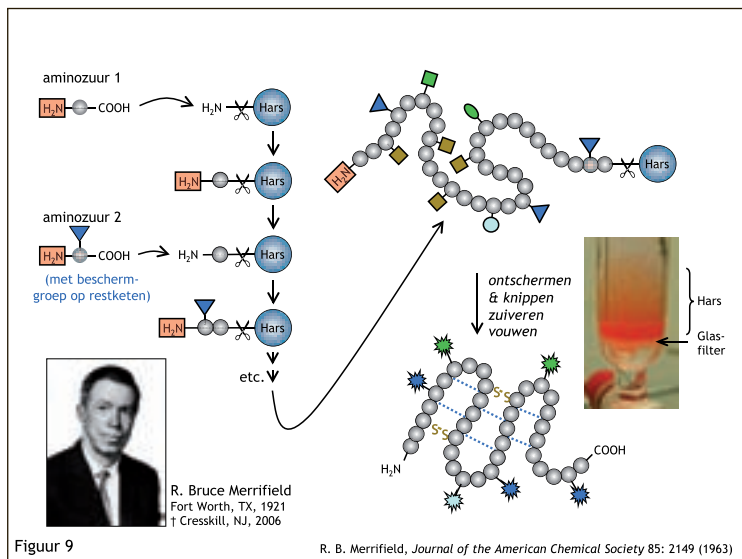
“..Terwijl behoedzame collega’s vrezen dat een rationeel onderzoek naar deze (eiwit) stoffen op onoverkomelijke hindernissen zal stuiten vanwege haar complexiteit en zeer lastige fysische eigenschappen, neigen andere

meer optimistische onderzoekers, onder wie ik mijzelf schaar, naar de overtuiging dat alle mogelijke middelen die ons ter beschikking staan dienen te worden ingezet om deze maagdelijke (eiwit)veste te belegeren, want hoe riskant de onderneming ook is, alleen zó kan de efficiëntie van onze methoden onderzocht worden...”

Zonder het te beseffen beschreef Fischer als organisch chemicus hier het adagium van de chemische biologie: het bestuderen, begrijpen, en beïnvloeden van biologische eiwitprocessen door gebruik te maken van álle ter beschikking staande organisch chemische gereedschappen.

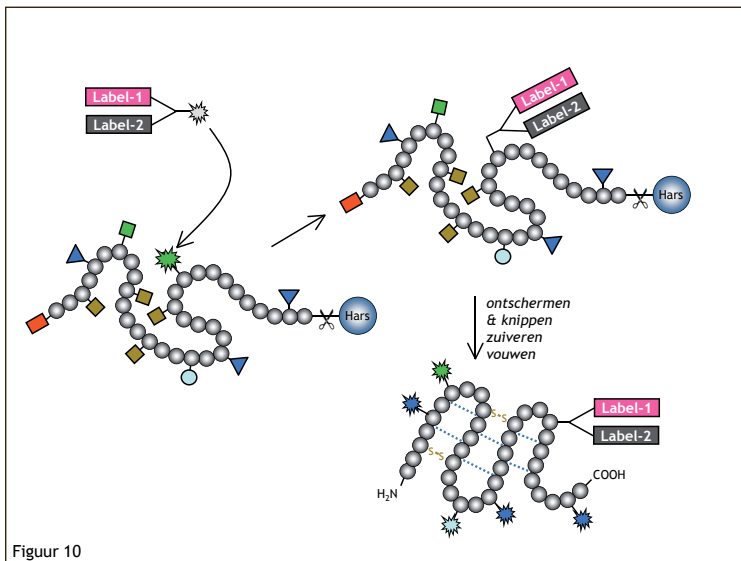
Meer dan een halve eeuw stortten peptidechemici zich vervolgens op het maken of het synthetiseren van peptideketens. De syntheses werd echter bemoeilijkt doordat deze voornamelijk in oplossing plaatsvonden, zodat veelvuldig de tussenproducten gezuiverd moesten worden, met het bijbehorende opbrengstverlies.

Het duurde tot 1963 tot de Amerikaanse wetenschapper en Nobelprijswinnaar Bruce Merrifield een methode uitvond waarmee peptides gesynthetiseerd konden worden aan een vaste drager, een harsbolletje, waardoor tijdens het aanrijgen van een aminozuurketting telkens de overtollige en afvalchemicaliën konden worden weggespoeld via een glasfilter. De groeiende peptideketting bleef dan aan het harsbolletje op het filter achter [figuur 9].



Het harsbolletje bevat een afsplitsbare koppeling met een H₂N- of aminogroep waaraan aminozuren één voor één gekoppeld kunnen worden. De aminogroep van het te-koppelen aminozuur is daarbij geblokkeerd. Nadat een aminozuur is gekoppeld kan deze aminogroep weer worden vrijgemaakt, zodat een volgend aminozuur gekoppeld kan worden. Het tweede aminozuur hier heeft een geladen restgroep, die ook geblokkeerd moet zijn omdat deze een nevenreactie zou kunnen veroorzaken tijdens een van de volgende stappen. Op den duur levert dit dus een lange ketting op van aminozuren waar alle reactieve groepen beschermd zijn. Als laatste stap van de synthese wordt het eiwit van de vaste drager afgesplitst terwijl alle beschermgroepen worden verwijderd. Het eiwit kan vervolgens worden opgevouwen en de waterstofbruggen en zwavelbruggen kunnen worden gevormd.

Het unieke van de chemische eiwitsynthese is dat we op een eenvoudige manier een vlaggetje ofwel een *label* aan een eiwit kunnen hangen, zodat we het kunnen volgen met allerlei analysemethoden en scanners aanwezig in het laboratorium en in het ziekenhuis. Het echte voordeel van chemische eiwitsynthese zit in de mogelijk tot selectieve labeling, het zelf *precies* kunnen kiezen hoeveel- en waar *labels* aan het eiwit zullen komen [figuur 10].



Figuur 10

Aan het eindpunt van het maken van de beschermde peptideketen kan namelijk selectief één restgroep of zijketen worden ontschermd. Aan deze ontschermd zijketen kan nu specifiek een *label* gekoppeld worden zodat we het uiteindelijke eiwit bij onze experimenten kunnen volgen.

Met deze stuurbare labelingsmogelijkheden onderscheid de chemische eiwitsynthese zich krachtig van de biologische eiwitsynthese. Bij het labelen van op biologische wijze verkregen eiwitten kan er géén gebruik gemaakt worden van beschermgroepen en men kan dus niet kan bepalen hoeveel *labels* er gekoppeld worden, en wáár deze terecht komen. Bij biologische eiwitten zijn alle aminozuurzijketens immers onbeschermd en kunnen dus reageren met een toegevoegd *label*. Het gevaar bij deze ongecontroleerde reacties is dat het *label* ongewild gekoppeld word aan een aminozuurzijketen die het eiwit nodig heeft voor de interactie met een ander eiwit, als gevolg waarvan de functie van het eiwit wordt verstoord.

Het gekoppelde *label* kan een fluorescente groep zijn, een zwaar metaal voor magnetische resonantie beeldvorming dat wordt afgekort als MRI, of een radioactief element voor foton of positron emissie tomografie die worden afgekort als SPECT of PET. Ook een combinatie van labels is mogelijk resulterend in zogenaamde multimodale beeldvormingmiddelen zoals hier afgebeeld.

Ik wil nu met U een 4-tal voorbeelden behandelen uit het verleden en het heden waarbij totale chemische eiwitsynthese, een techniek die door mij geïntroduceerd is bij de faculteit der Geneeskunde in Maastricht, succesvol is toegepast bij het bestuderen, begrijpen, in beeld brengen, en beïnvloeden van eiwitten en hun processen die verband houden met hart- en vaatziekten.

Ongewenste bloedstolsels in ons lichaam vormen een van de belangrijkste doodsoorzaken in onze westerse samenleving. Deze bloedstolselvorming, ofwel trombose, kan plaatsvinden in de slagaderen of in de aderen. De stolsels of trombii kunnen bloedvaten afsluiten op de plek waar ze gevormd worden, of ze laten los en worden door de bloedstroom meegevoerd in een proces dat emboliseren heet. Uiteindelijk lopen deze reizende stolsels of embolii ook vast en sluiten bloedvaten stroomafwaarts af. Door afsluiting van bloedvaten krijgt het achterliggende weefsel geen zuurstof, en sterft het af.

Het stolsel op deze dia komt uit de longen van een patiënt die is overleden aan een longembolie, een stolsel ontstaan als gevolg van veneuze trombose in het been, waarna het stolsel is losgeschoten en is vastgelopen in de longen [figuur 11].

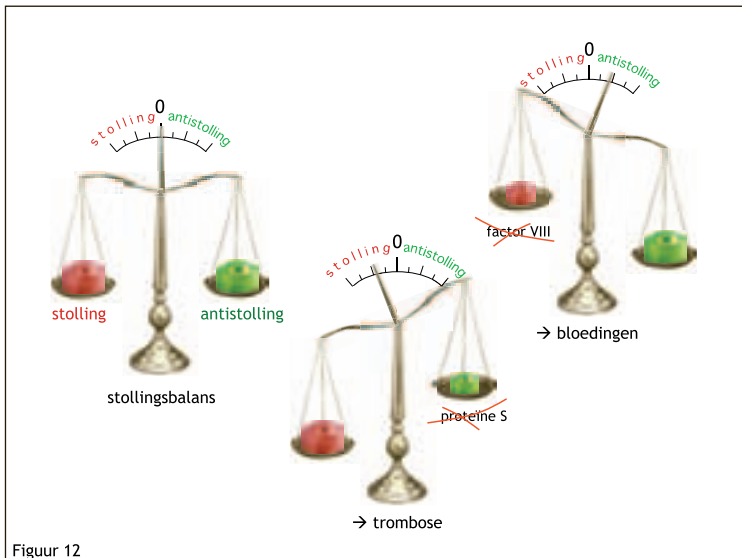
Tijdens de reguliere bloedstolling wordt een stolsel gevormd uit een combinatie van twee processen, de primaire stolling waarin bloedplaatjes



Longembolie

Figuur 11

samenklonteren en een bloeding stoppen, en de secundaire of eiwitstolling waarin het primaire stolsel gestabiliseerd wordt door een stevig vlechtwerk van fibrinedraden. Deze eiwitstolling komt echter niet pas op gang als wij ons verwonden, dit proces staat altijd aan, steeds worden *stollings*reacties tegengegaan door *antistollings*reacties, met als gevolg een evenwicht wat wij kennen als de stollingsbalans [figuur 12].



Figuur 12

Wij zijn dus eigenlijk altijd een beetje aan het stollen en altijd een beetje aan het antistollen, met de netto opbrengst van *vloeibaar* bloed dat door onze aderen stroomt. Als er nu in een van de complexe eiwitprocessen een foutje voorkomt, bijvoorbeeld als gevolg van een erfelijke afwijking die resulteert in een foutief of ontbrekend eiwit, dan kan dit evenwicht worden verstoord met alle gevolgen van dien.

Zo kennen wij allemaal de ziekte Hemofilie A waarbij het stollingseiwit factor VIII ontbreekt, waardoor de antistollingsreacties de overhand krijgen en er een bloedingsneiging ontstaat. Zo bestaan er ook verstoringen in de eiwitten van de antistollende schaal, waardoor de stollingreacties op hun beurt de overhand krijgen en er een groot risico op trombose ontstaat, bijvoorbeeld als wij het eiwit proteïne S missen.

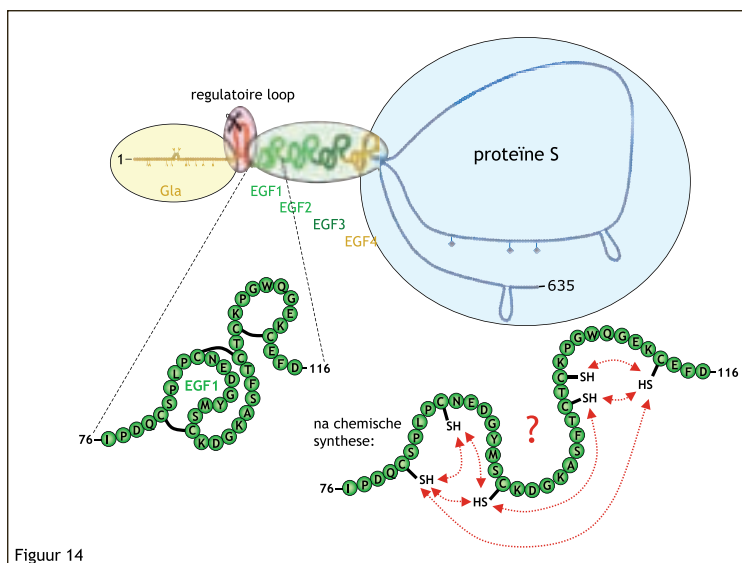
Proteïne S is een van de belangrijkste antistollende eiwitten in ons lichaam. Proteïne S is een hulpeiwit voor het antistollende enzym actief proteïne C, ofwel APC. APC zorgt ervoor dat bepaalde stollingseiwitten geïnactiveerd worden waardoor de stolling geremd wordt. APC kan dat alleen doen in aanwezigheid van proteïne S. Als het proteïne S eiwit gedeeltelijk afwezig of inactief is zal het risico op trombose daarom ook 10 keer stijgen. In het geval dat proteïne S volledig afwezig of inactief is treed er een zeer ernstige ziekte op die zonder behandeling fataal is.



neonatale Purpura Fulminans

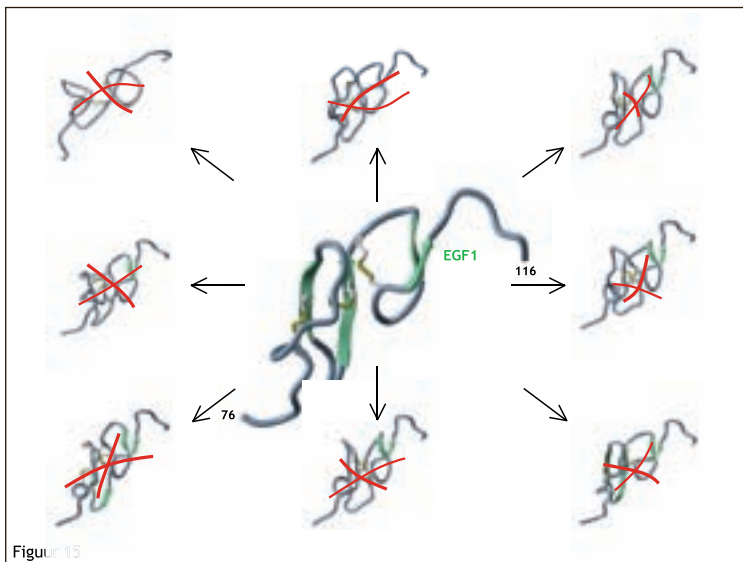
Een pasgeboren baby zonder functioneel proteïne S zal de stollingsactiviteit in het lichaam niet kunnen onderdrukken, en er zal een algehele stolling plaatsvinden in het microvaatstelsel waardoor uiteindelijk grote gedeeltes van de huid afsterven. Dit ziektebeeld staat bekend als Purpura Fulminans [figuur 13].

Om ziekteprocessen zoals deze die geassocieerd zijn met afwijkingen in proteïne S goed te kunnen begrijpen is veel kennis over de moleculaire werking van proteïne S nodig. Hiertoe is allereerst het eiwit in kaart gebracht, en het bestaat uit 635 aminozuren, 635 kralen aan een ketting, hier weergegeven als een platgedrukte kaart [figuur 14].



Proteïne S is opgebouwd uit verschillende domeinen. Dit zijn kleine eenheden in het eiwit met een eigen 3-dimensionale structuur en functie. De verschillende domeinen van proteïne S hebben dus ook verschillende functies. Het eerste domein noemen we het Gla domein en deze is belangrijk voor het binden van proteïne S aan celoppervlakken waar stollingsreacties plaatsvinden. Proteïne S heeft ook een regulatorisch domein dat geknipt kan worden om proteïne S te inactiveren als er meer stolling nodig is, en proteïne S heeft 4 EGF domeinen die belangrijk zijn voor de vorm van het eiwit. Tenslotte is er een groot domein dat nodig is voor binding aan een transporteiwit.

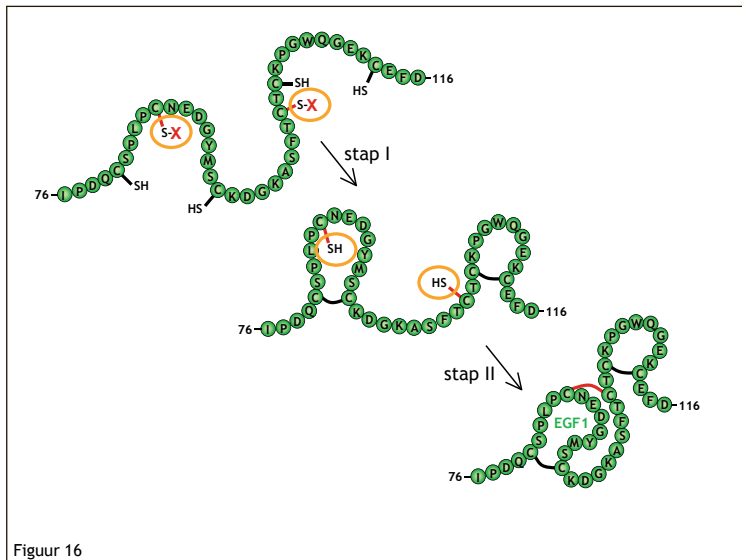
Nu bestond al langer het idee dat het EGF1 domein belangrijk zou kunnen zijn voor de binding van proteïne S aan zijn enzym APC, maar dit domein kon niet gemaakt worden door biologische systemen in het lab. Er werd gesuggereerd dat het geïsoleerde domein waarschijnlijk niet zelfstandig de juiste vorm zou kunnen aannemen. Wij hebben dit toen via chemische eiwitsynthese geprobeerd. Na chemische synthese krijgen wij dit echter dit EGF1 eiwitdomein in handen als een lange keten met 6 vrije cysteine aminozuren, die na vouwen van het eiwit uiteindelijk 3 zwavelbruggen zouden moeten vormen. Grote vraag was echter of elke cysteine wel zou weten wie haar bijbehorende partner zou moeten zijn. Als een compleet eiwit gaat opvouwen, gaat de zwavelbrugvorming meestal goed, maar problemen ontstaan wanneer stukjes eiwit uit hun moedereiwitvorm worden getrokken, zoals in dit voorbeeld van EGF1. We wisten wel hoe het EGF1 domein van proteïne S er uit moest zien op basis van gelijkenis met bekende structuren van andere EGF domeinen uit andere eiwitten [figuur 15].



Een rekensom leert dat als er 6 vrije cysteïnes aanwezig zijn in een eiwitketen er 15 mogelijkheden bestaan om drie zwavelbruggen te vormen waarvan er maar één goed is. Veel van deze foute varianten hebben wij bij ons vouwingsexperiment aangetroffen. Deze andere vormen vertegenwoordigen absoluut niet de vorm van het EGF1 in het moedereiwit proteïne S, en zijn dus waardeloos om functionele studies

mee te doen. We moesten een andere strategie zoeken en ook toen bracht alléén chemische eiwitsynthese uitkomst.

Als wij nu namelijk twee van de zes cysteine aminozuren blokkeerden, konden wij de zwavelbrugvorming in twee stappen uitvoeren. In de eerste stap werden de eerste twee zwavelbruggen correct gevormd door 4 cysteïnes [figuur 16].

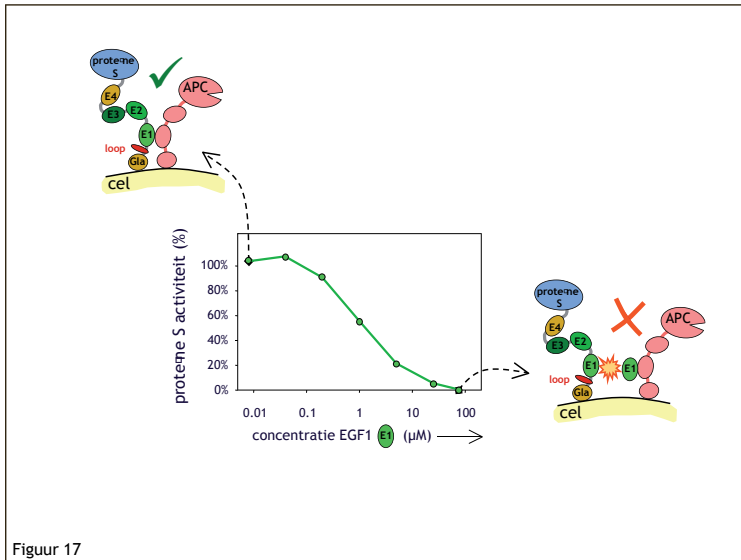


Figuur 16

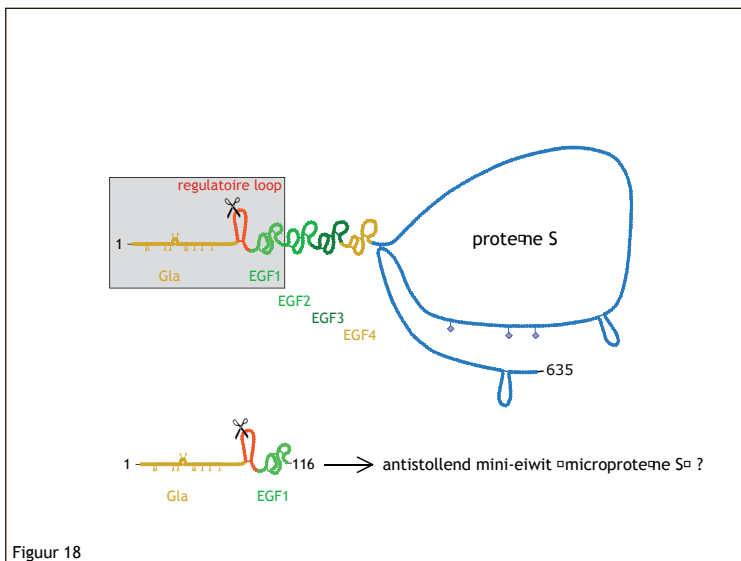
Vervolgens werden in de tweede stap de 2 laatste cysteïnes vrijgemaakt die geen andere keuze meer hadden dan de beoogde derde zwavelbrug te vormen wat leidde tot een correct synthetisch EGF1 domein.

Als we het EGF1 domein aan een werkend team van proteïne S en APC toevoegden zagen we dat EGF1 uiteindelijk volledig de antistollingsactiviteit van proteïne S kon remmen. Dit konden wij eenvoudig verklaren: Het actieve team van proteïne S en APC waar we mee begonnen in het experiment, werd uit elkaar gedreven door het synthetische EGF1 domein. Het geïsoleerde EGF1 domein en proteïne S binden immers aan dezelfde plaats op APC [figuur 17].

Nu het EGF1 domein verantwoordelijk bleek voor de binding van proteïne S aan het enzym APC, kregen wij een listig plan: zou het wellicht mogelijk zijn om het *loop* domein en het celoppervlak-bindende Gla domein aan het EGF1 domein te koppelen om zo tot een klein eiwit van 116 aminozuren te komen dat zelfstandig APC zou kunnen helpen om de bloedstolling te remmen. De naam "microproteïne S" hadden we al klaar [figuur 18].



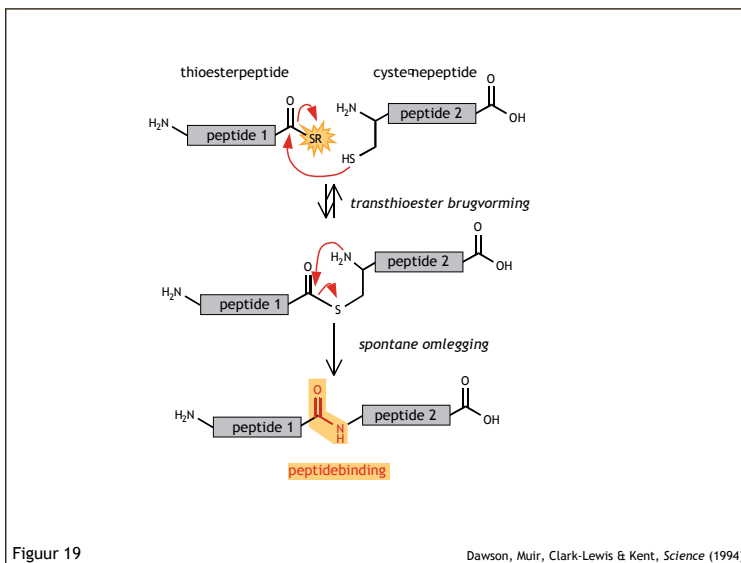
De synthese van een 116 aminozuren-lange ketting aan harsbolletjes is echter niet mogelijk. Het maximaal haalbare met de huidige methoden betreft 40-50 aminozuren. Wat nu te doen?



Sinds de uitvinding van vaste fase eiwitsynthese in 1963 hebben peptidechemici naarstig gezocht naar manieren om peptideketens aan elkaar te zetten zodat grotere eiwitten gemaakt konden worden. Hierin slaagden zij gedeeltelijk, de fragmenten konden worden weliswaar worden samengevoegd, maar nooit met de natuurlijke peptidebinding die er bestaat in biologische eiwitten.

Tijdens mijn verblijf in de 90-er jaren aan het Scripps Research Instituut in La Jolla, California, was ik in het lab van Steve Kent getuige van een van de grotere uitvindingen binnen de peptidechemie uit de vorige eeuw. Steve Kent en zijn AIO Phil Dawson slaagden erin peptidefragmenten samen te voegen tot een lange aminozuurketen met natuurlijke peptidebindingen. Zij noemden dit natieve chemische ligatie.

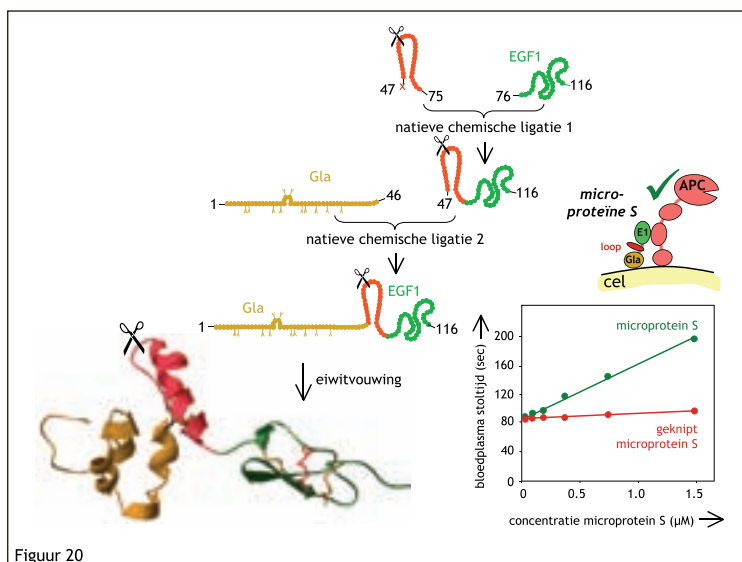
De truc was even eenvoudig als elegant, zoals met zoveel grote ontdekkingen. In plaats van een $-\text{COOH}$ uiteinde van het laatste aminozuur van een peptide, zorgden ze ervoor dat er een $-\text{COSR}$, een zogenaamd zwavelester of thioester uiteinde ontstond [figuur 19].



Als er dan een ander peptide bij werd gedaan dat begint met het aminozuur cysteine, trad er onder invloed van een katalysator een onnatuurlijke brugverbinding op waardoor de peptides aan elkaar gekoppeld werden. Wat hier echter op volgde was een spontane omlegging naar een natuurlijke peptidebinding die niet te onderscheiden was van een biologische peptidebinding.

Met deze reactie lag de wereld van de grotere eiwitten open voor de chemische eiwitsynthese.

Op deze wijze maakten wij ons microproteïne S uit drie stukken chemisch gesynthetiseerd eiwit en twee native chemische ligatie reacties. Allereerst koppelden we het loop domein aan het EGF1 domein, en vervolgens koppelden we het Gla domein aan het samengestelde loop-EGF1 domein. Daarna werd het 116 aminozuren lange microproteïne S peptide gevouwen [figuur 20].



Figuur 20

Het bleek dat het volledig chemisch gesynthetiseerde microproteïne S in aanwezigheid van APC in staat was de stollingstijd van bloedplasma te verlengen. Als het microproteïne S werd geknipt in de regulatoire loop werd er zoals verwacht geen activiteit meer waargenomen. Het uit chemische synthese verkregen microproteïne S wat nog geen 20% bedroeg van de grootte van het moedereiwit proteïne S bleek in staat op een subtiele wijze in een biologische stollingsreactie in te grijpen en deze te remmen.

Het meest opvallende aan deze studie was echter de vouwing van het EGF1 domein in microproteïne S. Er was namelijk geen chemische beschermtruc in het EGF1 domein meer nodig: in aanwezigheid van de buurdomeinen van het EGF1, het Gla domein en de regulatoire loop, vouwde het EGF1 spontaan goed. De Gla en loop domeinen vormden

hier als het ware een mal of matrijs waardoor het EGF1 domein zijn goede conformatie zelf kon vinden. En hiermee werd een belangrijke hypothese van de eiwitvouwing in het algemeen bevestigd: De beroemde eiwitchemicus Christian Anfinsen postuleerde al ruim 40 jaar geleden dat “...de informatie die nodig is voor het vouwen van een eiwit besloten ligt in de primaire sequentie, en dus in de aminozuurvolgorde van het eiwit” [figuur 21].

□...the native conformation [of a protein]
is determined by the totality
of interatomic interactions and hence
by the amino acid sequence...□

Christian B. Anfinsen
Nobel Lecture, December 11, 1972



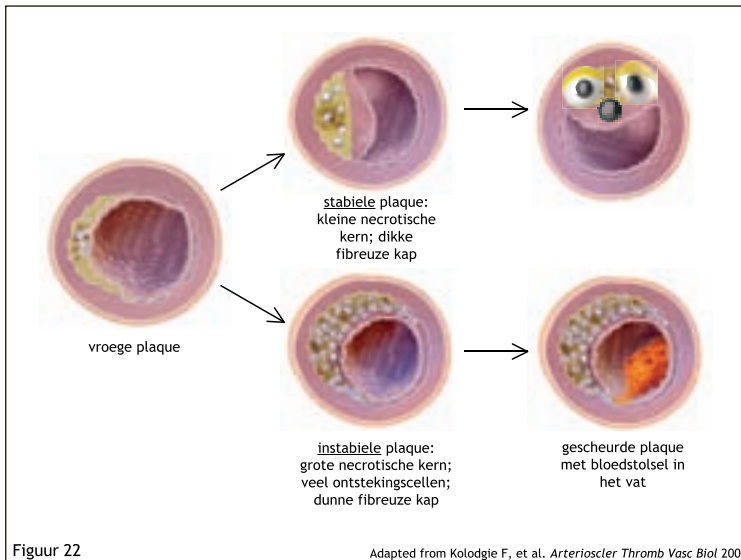
Figuur 21

Met dit voorbeeld heb ik duidelijk willen maken hoe chemische synthese kan helpen om werkingsmechanismen van eiwitten op te helderen, in het bijzonder als eiwitten niet gemaakt kunnen worden met reguliere moleculaire biologische technieken.

Zoals gezegd zullen verstoringen in proteïne S activiteit vooral leiden tot veneuze trombose, in het been, met kans op een levensbedreigende longembolie. Een veel vaker voorkomende doodsoorzaak wordt echter gevormd door stolsels als gevolg van arteriële trombose door atherosclerose. Ook bij de detectie van trombose en atherosclerose zullen chemisch gesynthetiseerde slimme eiwitten een grote rol gaan spelen.

De vorming van atherosclerotische plaques is een langzaam voortschrijdend ontstekingsproces waarbij het slechte plasmacholesterol LDL de vaatwand binnendringt en in de vaatwand wordt veranderd.

Hierdoor worden witte bloedcellen uit de bloedbaan aangetrokken, die als macrofagen het gemodificeerde cholesterol in de vaatwand opnemen [figuur 22].



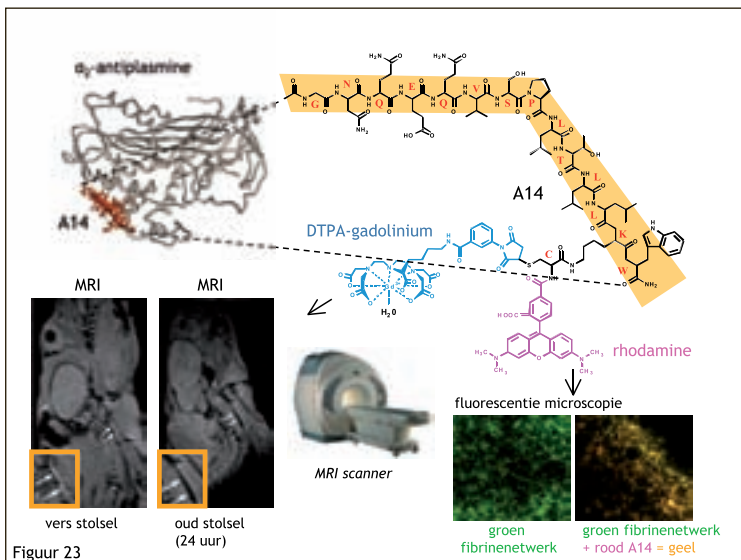
Sommige van deze macrofagen begeven zich weer in de bloedbaan, andere blijven achter in de vaatwand als schuimcellen en gaan uiteindelijk dood, en de mate van ophoping van deze schuimcellen in een plaque bepaald of een plaque stabiel of instabiel wordt.

Een stabiele plaque heeft een verdikking in de vaatwand die goed bedekt is met spierweefsel en sterke eiwitvezels, en zal tot in lengte van dagen aanwezig kunnen zijn zonder zijn drager last te bezorgen, je kunt er zelfs 100 mee worden. Als de macrofagenophoping echter te groot wordt zal een gedeelte in de vaatwand afsterven en zal er plaque progressie plaatsvinden naar een instabiele toestand met een slecht gedefinieerde afdekking van de plaque, die makkelijk kan scheuren. Dit zijn de tijdbommen in ons lichaam.

Op het moment dat deze plaques scheuren ontstaan er bloedstolsels doordat een weefselgebonden stollingsactivator in contact komt met bloed en het terplekke zal doen stollen. Als door deze bloedstolsels afsluitingen ontstaan in de kransslagaders van het hart spreken we van een hartaanval, als de afsluitingen plaatsvinden in de hersenen spreken we van een beroerte.

De behandeling van hartaanvallen en beroertes, maar ook van longembolien bestaat uit het zo snel mogelijk toedienen van bloedstollingremmers. Vervolgens wordt geprobeerd het stolsel “op te lossen” door trombolyse, in het algemeen door het toedienen van het eiwit weefsel plasminogeen activator of tPA, die plasminogeen omzet in plasmine, dat vervolgens het fibrinenetwerk van het bloedstolsel afbreekt. Het probleem met tPA is dat het alleen werkt bij verse stolsels en dus dient tPA direct, en in ieder geval binnen een paar uur te worden toegediend. Oude stolsels zijn niet meer gevoelig voor deze therapie, en als tPA dan toch toegediend wordt, krijgt de patiënt alleen maar last van de riskante bloedingsbijwerkingen van deze behandeling.

De natuur heeft de bloedstolling natuurlijk verzonnen om zoveel mogelijk bloed in ons lichaam te houden. Het is daarom ook belangrijk dat een bloedstolsel dat gevormd wordt na een snee of verwonding een tijdje beschermd wordt tegen al te snelle afbraak door het eigen lichaam. Ook daar heeft de natuur slim ingegrepen, want tijdens de laatste fase van de bloedstolling wordt er een remmer van plasmine, het α_2 -antiplasmine, aan het stolsel gekoppeld waardoor het stolsel een tijdje beveiligd blijft [figuur 23].



Er is gevonden dat het gedeelte van α_2 -antiplasmine dat gekoppeld wordt aan fibrine zich aan het begin van het eiwit bevindt, het zogenaamde A14 domein. Wij hebben dit gedeelte chemisch nagemaakt, en voorzien van een rood fluorescent label, en ook het zware metaal gadolinium voor de meting met MRI. Als wij dan in het lab van bloedplasma een vers fibrinestolsel maken dat groen gekleurd is, zien wij dat er ná toediening van A14 een geel netwerk ontstaat, door de koppeling van het rode A14 aan het groene fibrine netwerk. Als vervolgens een MRI meting plaatsvindt bij een muis met een vers stolsel in een van de halsslagaders, dan zien we deze duidelijk oplichten op de MRI scan, in tegenstelling tot een muis waarin dit stolsel al een dag aanwezig is.

Dit betekent niet alleen dat ons chemisch gesynthetiseerd A14 eiwit in het lichaam verse stolsels kan opsporen, maar ook dat er op basis van een stolselherkenning met A14 besloten kan worden of behandeling met het trombolyticum tPA zinvol zou kunnen zijn. Op dit ogenblik wordt samen met het chemieconcern DSM de mogelijkheid onderzocht om dit gelabelde A14 onder *good manufacturers practice* regime te produceren zodat er een aanvang gemaakt kan worden met het onderzoek naar een mogelijke toepassing in de kliniek.

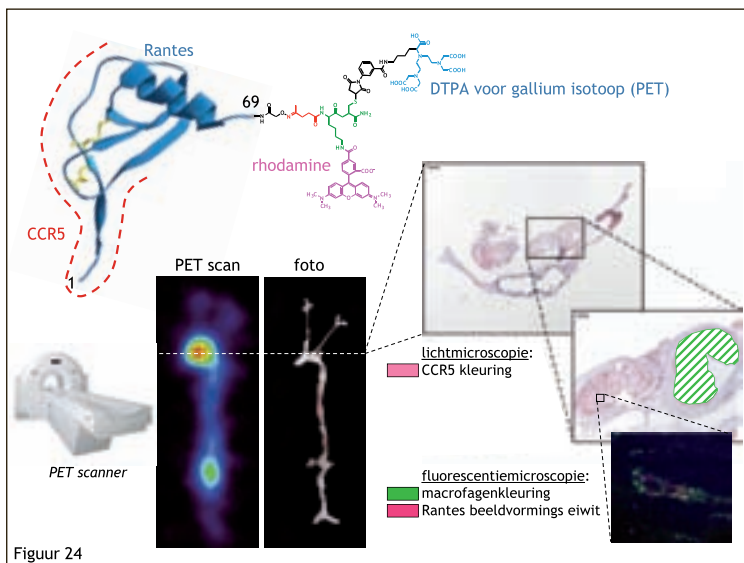
Ik heb hier laten zien dat met slimme moleculen verkregen door chemische eiwitsynthese bloedstolsels kunnen worden aangetoond *in vivo*, in een levend organisme, waarbij het fibrinenetwerk aanwezig in het stolsel fungeert als zogenaamde *biomarker*. Omdat het stolsel er al is spreken we hier van een diagnostische biomarker. Veel beter zou het echter zijn om biomarkers te vinden die het vormen van een bloedstolsel voorspellen, voordat het kwaad is geschied, zogenaamde prognostische biomarkers, zodat preventieve behandeling kan plaatsvinden onder het motto *voorkomen is beter dan genezen*.

Op de afdeling pathologie van ons ziekenhuis hebben onderzoekers o.l.v. Mat Daemen en Sylvia Heeneman gevonden dat in instabiele plaques een sterke verhoging van de eiwitreceptor CCR5 waarneembaar was t.o.v. stabiele plaques. Als we ons realiseren dat CCR5 voornamelijk voorkomt op het oppervlak van macrofagen en dat macrofagen vooral voorkomen in instabiele plaques dan snijdt dit hout en zou CCR5 wel eens een prognostische biomarker kunnen zijn voor een plaqueruptuur met als gevolg een hartaanval of beroerte. Maar hoe kunnen we CCR5 *in vivo* aantonen?

Nu is het zo dat CCR5 in ons lichaam een natuurlijke bindingspartner of ligand eiwit heeft. Dit eiwit heet RANTES, bestaat uit 68 aminozuren, en bindt sterk aan CCR5. Wij hebben dit RANTES eiwit chemisch gemaakt,

met behulp van vaste fase eiwitsynthese en natieve chemische ligatie, met daaraan gekoppeld een label voor fluorescente metingen en een label voor een radioactieve PET-scan.

Als we nu kijken naar een model van het eiwit RANTES en we weten dat een groot gedeelte van RANTES contact maakt met haar receptor CCR5, is het dus niet toegestaan is om op die plaats labels aan te brengen omdat dit de binding aan CCR5 zou kunnen verstoren. Als veilige plaats werd daarom gekozen voor het uiteinde van RANTES waaraan ons bimodale label werd bevestigd. Een keuze die alleen mogelijk is door het gebruik van chemische eiwitsynthese [figuur 24].



In samenwerking met afdelingen pathologie, radiologie en biofysica zijn we op dit moment bezig met het uittesten van dit RANTES beeldvormingsmiddel voor het aantonen van instabiele plaques. Met gebruik van muizen die erfelijk zijn belast met hoge cholesterolgehalten in hun bloed en die spontaan atherosclerotische plaques vormen hebben wij met een PET scan gezien dat het radioactieve RANTES terecht komt in de aortaboog, vlak bij de afsplitsingen naar de halsslagaders. Dit is te zien als je de PET scan vergelijkt met een normale foto van de uitgenomen aorta, de hoofdslagader die uit het hart komt. Als er dan een schijfje uit deze aorta werd gesneden konden daarin overtuigend vergevorderde plaques geïdentificeerd werden.

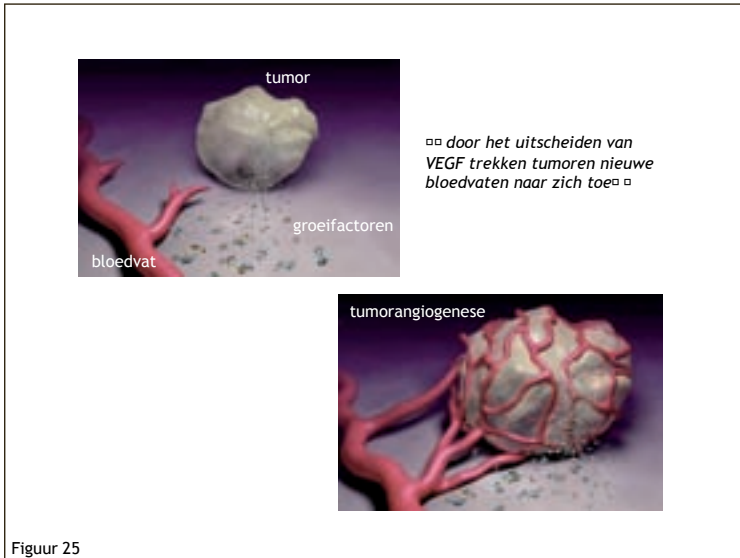
Duidelijk zichtbaar is hoe de plaques de ruimte in het bloedvat opvullen, en de roze kleur die CCR5 aangeeft laat zien dat deze plaques rijkelijk gevuld zijn met CCR5. Bij een nóg grotere vergroting van een stukje plaque, bekeken onder de fluorescentiemicroscopie zijn individuele macrofagen zichtbaar in het groen. De extra roodkleuring werd veroorzaakt door het gelabelde RANTES dat aan de macrofagen is gebonden. Het positieve signaal van de radioactieve PET scan kon dus worden teruggevoerd op de moleculaire lokalisatie van gelabeld RANTES aan CCR5 in de macrofaagrijke plaque. Dit biomoleculaire contrastmiddel zou dus gebruikt kunnen worden om instabiele plaques op te sporen voordat zij scheuren, en zo van prognostische waarde kunnen zijn voor een komend hartinfarct of beroerte. Dit onderzoek is gaande, en ik houd u op de hoogte.

Het concept van moleculaire beeldvorming van ziekte door het aantonen van daarbij tot expressie komende biomarkers zullen wij in de toekomst gaan uitbreiden naar een tweetrapsrakiet. In veel gevallen vindt er momenteel behandeling plaats bij verdenking op een ziektebeeld zonder dat dit nodig is. Hierbij ondergaan de patiënten onnodig de vaak risicovolle bijwerkingen van medicijnen zonder de voordelen. In het geval van positieve identificatie van ziekte via moleculaire beeldvorming met slimme eiwitten, zouden we een tweede toediening kunnen toepassen, maar nu met een therapeuticum, dat zodanig veranderd is dat het een affiniteit krijgt voor het gebruikte beeldvormingseiwit. Dit brengt 3 voordelen met zich mee: allereerst worden alleen patiënten behandeld waarbij het medicijn de grootste mogelijke kans van succes heeft, ten tweede concentreert het medicijn zich bij deze patiënten op de plaats waar het meest nodig is, waardoor ten derde, een lagere dan reguliere dosis van het medicijn al effectief kan zijn. Wij hebben inmiddels al chemisch klittenband ontworpen waarmee het medicijn aan onze beeldvormingseiwitten kan binden, en zullen in de komende jaren het conceptuele bewijs voor deze methode gaan aantonen.

Tot slot van mijn chemische eiwitsynthese promotietour wil ik U een voorbeeld geven van een chemisch gesynthetiseerd eiwit als slim medicijn, of liever gezegd als vaccin, dat toegepast zou kunnen worden bij anti-kanker behandelingen.

Als een tumor groeit, zal er vrij snel binnen in de tumor zuurstoftekort optreden. Daardoor zal de tumor groeifactoren aanmaken en die gaan uitscheiden. Een van de belangrijke groeifactoren is vasculair-endotheliale groeifactor of VEGF. VEGF zal zorgen dat naburige bloedvaten zullen uitstulpen en groeien in de richting van de tumor.

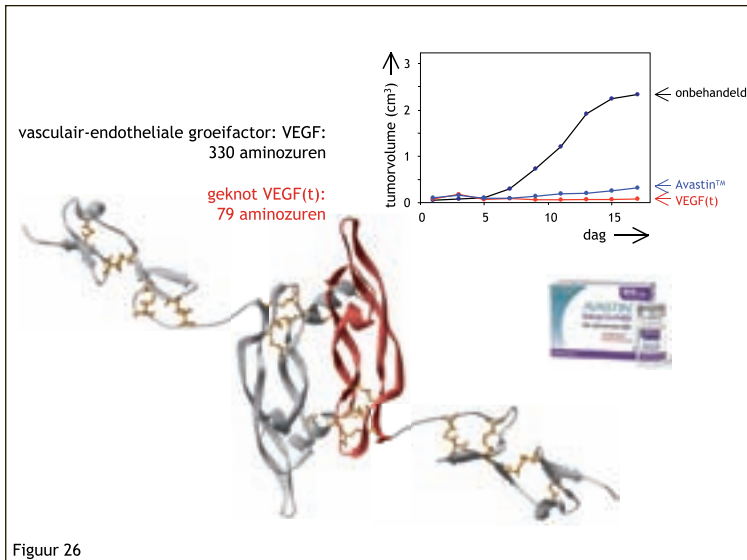
Dit aanleggen van nieuwe bloedvaten heet angiogenese. Via dit nieuw aangelegde bloedvatensysteem krijgt de tumor dan weer genoeg zuurstof en voedingsstoffen om te kunnen groeien [figuur 25].



Door het remmen van deze angiogenese kan het groeien van een tumor theoretisch gezien gestopt worden. De huidige behandeling van een aantal vormen van kanker bestaat dan ook uit de toediening van antilichamen tegen VEGF onder de merknaam Avastin, waardoor deze groeifactor onschadelijk gemaakt wordt en tumorgroei geremd wordt. Het VEGF is een eiwit van 330 aminozuren dat in vorm wordt gehouden door een flink aantal zwavelbruggen. In samenwerking met Peter Timmerman van de UVA, Rob Meloen van Pepscan en Arjan Griffioen van het VU medisch centrum kregen wij het idee om een chemische VEGF variant te maken, een klein stukje VEGF dat zelf niet actief zou zijn bij het stimuleren van angiogenese, maar voldoende immunogeen is om het eigen immuunsysteem aan te zetten tot antilichaam productie, tegen het lichaamseigen VEGF.

Deze 79 aminozuren lange VEGF variant werd gemaakt met vaste fase eiwit synthese en natieve chemische ligatie, en vervolgens gevouwen. Hiermee werden ratten gevaccineerd en na verloop van tijd werden antilichamen tegen menselijk VEGF in het bloed van deze ratten aangetoond. Als deze antilichamen nu werden toegepast in een

muizemodel van menselijke darmkanker, zagen wij dat de antilichamen die door onze vaccinatiestrategie waren opgewekt bijzonder effectief waren in het onderdrukken van de tumorgroei [figuur 26].



Bij onbehandelde tumoren trad er binnen twee weken een 25-voudige toename van het tumorvolume op. Als de tumoren behandeld werden met Avastin, werd de tumorgroei sterk onderdrukt. De antilichamen opgewekt tegen ons chemisch gesynthetiseerde VEGF vaccin waren echter zo effectief dat de tumorgroei vrijwel volledig tot staan werd gebracht. Het principe van vaccinatie tegen kanker is dus hiermee aangetoond en dit laat zien dat náást biomarker detectie chemische eiwitsynthese zeer bruikbaar kan zijn voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutica.

Ik hoop dat U net als ik overtuigd bent geraakt van het belang van chemische eiwitsynthese voor het bestuderen, begrijpen, en beïnvloeden van ziekteprocessen, ook buiten het gebied van hart en vaatziekten. Ik hoop ook dat U iets heeft geleerd van mijn vak en begrijpt dat ik, bijna altijd, fluitend naar mijn werk fiets.

Er is wel eens gezegd dat wetenschap mensenwerk is. Ik wil daar iets aan toevoegen: pas als het klikt tussen mensen is het mogelijk om het onderzoek naar een hoger plan te tillen. Ik ben er in de grond van mijn hart van overtuigd dat je het beste onderzoek kunt doen met mensen die je ook op je verjaardag zou uitnodigen. Ik heb tot nu toe veel geluk gehad in het wetenschappelijke leven want ik heb veel geweldige collega's om mij heen die het dagelijkse wetenschappelijke werk tot een feest maken. Mijn werk binnen de biochemie van de trombose en hemostase drijft op samenwerkingen met de meeste collega's en stafleden van onze vakgroep Biochemie. Voor hetgeen dat ik vandaag heb gepresenteerd wil ik de volgende mensen nog speciaal noemen [figuur 27].

 <p><u>Biochemie:</u> Jan Rosing Anouk Dirksen (→ TSRI) Wencke Adriaens (→ TU/e) Dennis Suylen Pieter Van de Vijver Gerry Nicolaes</p> <p><u>Biofysica:</u> Marc van Zandvoort Lenneke Prinzen Kim Douma</p> <p><u>Radiologie:</u> Eline Kooi Walter Backes Marlies Oostendorp</p>	 <p><u>Pathologie:</u> Mat Daemen Arjan Griffioen (→ VUMC) Robbert-Jan Miserus Sylvia Heeneman Erik Biessen Veronica Herias</p> <p><u>Fysiologie:</u> Mark Post</p>	 <p><u>Mol. & Exp. Med:</u> John Griffin Mary Jo Heeb José Fernandez Subramanian Yegneswaran</p> <p><u>Cell Biology:</u> Steve Kent (→ U Chicago) Phil Dawson Anouk Dirksen</p>
 <p>Bert Meijer Maarten Merks Sander Langereis (→ Philips)</p>	 <p>Peter Timmerman (UVA) Rob Meloen</p>	

Figuur 27

Figuur 27

De eiwitsyntheses drijven op de harde kern van het eiwitchemische lab: Anouk Dirksen, Wencke Adriaens, Dennis Suylen, Pieter Van de Vijver, en sinds kort Liesbeth Scheers, zonder jullie was er geen oratie. Gerry Nicolaes, moleculaire modelleerder, jouw voorspellingen worden binnenkort betrouwbaarder dan experimentele resultaten.

Als geen ander bestaat mijn werk uit een multidisciplinaire aanpak van een klinisch probleem. Waar zou de Biochemie zonder de hulp van collega's van Biofysica, Radiologie, Pathologie, en Fysiologie. Heren en dames bedankt!

Bert Meijer, Maarten Merckx en Sander Langereis wil ik bedanken voor de altijd prettige samenwerking, daar zal niets aan gaan veranderen in de toekomst. Peter Timmerman, Rob Meloen, en Arjan Griffioen, onze projecten zijn net zo spannend als gezellig. Het feit dat iedereen maar verhuist naar andere universiteiten doet daar gelukkig niets aan af.

A special word of thanks to our colleagues from Scripps, John Griffin, Steve Kent and Phil Dawson, the protein and chemistry wizzards: my love for synthetic protein chemistry started in your labs and was continuously fed by your marvellous ideas and challenges. I never really took the opportunity to thank you for all your efforts and support. Many thanks for having me all those years, and thank you for being here today, it means a lot to me.

Als mannen de 50 naderen, begint er vaak iets te kriebelen, en sommigen nemen een motorfiets, sommigen een vriendin, ik kan U iets aanraden, start een universitaire *spin off*. Het slurpt al je vrije momenten op, is ontzettend leerzaam, maar vooral ook vreselijk leuk. Yigal Pinto, Marcel Kannekens, en Mat Daemen, cofounders van ACS Biomarker, bedankt voor de komende jaren!

Bonno Bouma, promotor, vriend en gelijkgestemde. Jij ontstak het vuur voor proteïne S in mij, nu al 21 jaar de rode draad in mijn onderzoek. Jij maakte me opmerkzaam op La Jolla, dat was de beste tip in mijn leven. We zijn elkaar nooit uit het oog verloren, en ik dank je voor je jarenlange support en betrokkenheid bij mijn carrière.

Jan Rosing, man van staal. Twee dagen met jou en Guido in het lab begin 1994 deden mij kiezen voor een terugkomst naar Nederland in Maastricht. Nergens ter wereld had ik toen toch ook al wat oudere wetenschappers nog zo intensief en gemotiveerd in het lab bezig gezien. jouw wetenschappelijke zelfkritiek is formidabel, maar eigenlijk in contrast met de geringe twijfel aan je eigen gelijk. Jij was de eerste in Nederland die geloofde in een organisch chemisch lab binnen de faculteit der Geneeskunde, en zonder jou was het ook niet zo goed gelukt. Jan, je bent de beste coach die iemand zich kan wensen, en ik hoop dat je nog heel lang blijft.

Wim Kolkman, schoonvader, je was en bent altijd geïnteresseerd in het reilen en zeilen aan de Universiteit, dank je wel voor je betrokkenheid, en wat is het ontzettend jammer dat Josien er vandaag niet meer bij kan zijn.

Lieve Pa en Ma, lieve broers, bij jullie is het allemaal begonnen, bij jullie en met jullie ben ik opgegroeid. We hebben ontzettend veel lol gehad. Pa en Ma, bedankt voor een heerlijke jeugd, en het geduld en de tolerantie voor mijn experimenteerdrijven. Op een dag als vandaag kijk je toch even terug, en realiseer je je hoe bevoorrecht je eigenlijk bent, maar ook hoe vanzelfsprekend je dit ook eigenlijk altijd gevonden hebt. Ik heb veel van jullie energie verbruikt, en het verbaast me dan ook hoe vitaal jullie alle twee nog zijn. Ik hoop dat jullie dat tot in lengte van jaren blijven. Pa, jij bent nog steeds te vinden in de laboratoria van de faculteit Diergeneeskunde in Utrecht, waar je nog steeds groeihormoonbepalingen doet voor klinische studies. Ik hoop dan ook van harte dat ik jouw *eiwitten* heb. Lieverds bedankt voor mijn leven, ik ben er erg blij mee.

Aan het einde van mijn werkdag fiets ik naar huis, ook fluitend. Het is heerlijk om bij je gezin thuis te komen. Ik heb mijn plek gevonden. Mijn werk maakt me blij, maar jullie Lianne, Wenzel, Julius, en Anemone, maken mij gelukkig. Het leven met jullie is inspirerend, veelzijdig en spannend, en het wordt eigenlijk alleen maar leuker. Mijn liefste Lianne, verhalen zoals die van ons die lopen goed af.

Ik heb gezegd.

